

На правах рукописи

АНТОСЮК ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА *DROSOPHILA MELANOGASTER*
В УСЛОВИЯХ РАДИАЦИОННОГО И ХИМИЧЕСКОГО СТРЕССА

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Белгород- 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Марвин Александр Михайлович,

доктор биологических наук

Снегин Эдуард Анатольевич

Официальные оппоненты:

Куликов Алексей Михайлович, доктор биологических наук, ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова» РАН, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией эволюционной генетики развития

Саранцева Светлана Владимировна, доктор биологических наук, ФГБУ

«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова»

Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», заместитель
директора по научной работе, заведующая лабораторией экспериментальной и
прикладной генетики

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Защита состоится « » 2017 г. в час. на
заседании объединенного совета по защите диссертаций на соискание учёной
степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Д 999.068.03 на
базе ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный
исследовательский университет», ФГБНУ «Научный центр психического
здоровья», ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, по адресу: 308015, г.
Белгород, ул. Победы, 85

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» и на сайте www.bsu.edu.ru

Автореферат разослан « » 2017 г.

Ученый секретарь объединенного совета по защите
диссертаций на соискание ученой степени
кандидата наук, на соискание ученой степени
доктора наук Д 999.068.03
доктор биологических наук, доцент

И.Н. Сорокина

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Изучение генетической нестабильности и устойчивости популяций в меняющихся условиях окружающей среды – одна из основных проблем эволюционной генетики и экологии. Онтогенетическая изменчивость, уровень мутагенеза изменяются при воздействии факторов стресса различной природы и являются ключевыми для изучения данной проблемы, которая остаётся актуальной в связи с увеличивающимся антропогенным воздействием, и соответственно возрастающим химическим и радиоактивным загрязнением биосферы.

Нестабильность генома – возросшая потенция генома к приобретению мутаций, вследствие нарушений различных процессов, участвующих в репликации и стабилизации генома. Явление геномной нестабильности проявляется в повреждении наследственных структур и высокой чувствительности к воздействию факторов стресса. Нестабильное состояние генома может возникать в соматических и половых клетках под воздействием факторов стресса разной природы таких, как радиация и химические агенты. В качестве модельного объекта для изучения данных явлений использовались линии дикого типа *Drosophila melanogaster*. Большинство исследований по изучению индуцированной геномной нестабильности проведено на облученных высокими дозами ионизирующей радиации линиях *D. melanogaster* (Zabanov et al., 1995; Schweizer et al., 2000). Также проведен анализ индукции геномной нестабильности под действием низких хронических доз (Zainullin et al., 2008; Lushkova et al., 2011; Kravets et al., 2010).

В ряде исследований, посвященных изучению геномной нестабильности как одной из составляющих развития патологических состояний и заболеваемости у населения, исследуется естественная геномная нестабильность (Ayaradikannan et al., 2014). Естественная геномная нестабильность может являться причиной возникновения наследственных синдромов, тогда как индуцированная геномная нестабильность проявляется в увеличении частот мутаций в различных генах, например, генах ответственных за репарацию либо трансформацию опухолевых клеток (Ranzani et al., 2013). Подобные изменения в геноме приводят к ослаблению адаптационных резервов организма или становлению процессов, так называемой дезадаптации, т.е. большей чувствительности к факторам стресса. Но также из литературных источников известно, что геномная нестабильность может возникать при воздействии факторов стресса различной природы, но эффект, который следует за изменением активности мобильных генетических элементов может быть разным. Формируется повышенная чувствительность к определенным изменениям среды либо же адаптация к определенному фактору стресса (Chung et al., 2007). Так, в отношении химического фактора стресса (лекарственных препаратов), в частности метотрексата, сначала на лейшмании (Kündig et al., 1999), а впоследствии и на *D. melanogaster*, установлено, что адаптация формируется благодаря механизму амплификации соответствующего гена, определяющего устойчивость к метотрексату (Affleck et al., 2006). Известно, что в изменчивых условиях среды лучшей приспособленностью и выживаемостью обладают особи с меньшей геномной стабильностью и отбираются организмы с низким уровнем репрессии мобильных генетических элементов. Соответственно в стабильных условиях среды отбор происходит в отношении организмов с более высоким уровнем сайленсинга мобильных генетических элементов (Галицкий, 2009).

Цель работы: Охарактеризовать изменение стабильности генома, вызванное влиянием различных стрессовых факторов на линии дикого типа *D. melanogaster*.

Задачи исследования:

1. Провести анализ наследственной изменчивости в линиях дикого типа *D. melanogaster*: «Host» (Екатеринбург, 2005), «Биос-3» (Дзуреченск, 2007), «Белгород» (Белгород, 2006)

2. Оценить уровень фертильности, частоту гибели потомства на эмбриональной стадии развития после воздействия различных видов излучений (рентгеновское, γ -излучение и β -излучение) и цитостатических препаратов (гельданамицин, метотрексат, этопозид, циклофосфан и митомицин-С) как косвенные показатели геномной нестабильности.

3. Провести анализ гетерогенности расположения *P* и *hobo* элемента в линиях дикого типа *D. melanogaster*.

4. Исследовать воздействие стресса химической и физической природы на соматические клетки (изменение пространственной структуры крыла).

5. Провести сравнительный анализ линий дикого типа в отношении активизации геномной нестабильности при длительной направленной селекции в присутствии метотрексата.

6. Сравнить изменение пространственной структуры крыла у гибридных линий, полученных с использованием линий дикого типа и мутантной линии *vestigial*, подвергнутых длительной направленной селекции с изменением пространственной структуры крыла, с линиями, подвергшимися длительной направленной селекции в присутствии метотрексата.

Сформулирована гипотеза, лежащая в основе исследования: ионизирующее излучение, цитостатики, межлинейные скрещивания и длительная направленная селекция как стрессовые факторы приводят к изменению активности дестабилизации генома, что может иметь разные последствия для различных гетерогенных популяций *Drosophila melanogaster*.

Научная новизна. Впервые показано, что цитостатические препараты различного механизма действия могут вызывать сходный генотоксический и тератогенный эффект. Установлено, что на одну и ту же линию дикого типа дрозофилы различные факторы стресса производят эффект, который может быть различным. Также, что резистентность разных линий, отловленных из природы, при воздействии разных факторов стресса различна, и это в свою очередь позволяет искусственно классифицировать данные линии как устойчивые и чувствительные к определенным воздействиям. Впервые показано, что действие направленной селекции в совокупности с воздействием химического фактора стресса имеет различный адаптивный ответ: адаптивную силу, либо адаптивную слабость. Адаптивная слабость выражалась в гибели особей из линии «Белгород», претерпевших 76 поколений направленного отбора в присутствии метотрексата, что вполне могло быть следствием снижения уровня изменчивости на фоне уменьшения активности мобильных генетических элементов (в частности *hobo*-элемент). На основании проведенных исследований возможно создание теоретической модели становления наследственных заболеваний на фоне факторов антропогенной природы.

Научно-практическая значимость работы. Изучение действия различных видов ионизирующего излучения и лекарственных препаратов на активизацию геномной нестабильности с использованием как косвенных, так и прямых методов

на линии дикого типа *D. melanogaster* как модельном объекте позволит понять механизмы становления адаптации и возможной роли мобильных генетических элементов в этом процессе. Полученные результаты могут быть использованы для решения ряда эколого-эволюционных и генетических проблем. Также результаты могут послужить основанием для более тщательной защиты генома при лучевой и химиотерапии у пациентов с применением индивидуального подхода. Результаты исследований используются в учебном процессе в Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (ВГАОУ ВПО УрФУ) (спецкурс «Дрозофила как модельная система».)

Апробация работы. Основные положения и результаты научных исследований были доложены на конференциях «Биосфера Земли: прошлое, настоящее и будущее» ИЭРиЖ (Екатеринбург, 2008); «Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека» (Томск, 2009); III Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия – 2010» НГУ им. Н.И.Лобачевского (Нижний Новгород, 2010); II Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» (Украина, Одесса, 2010); VI Международной научно-практической конференции «Тяжелые металлы и радионуклиды в окружающей среде» СГПИ (Казахстан, Семипалатинск, 2010); V Всероссийском с международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» ТГУ (Тверь, 2012); конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» (Ростов-на-Дону, 2013); VI Всероссийском с международным участием конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); VI Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» (Украина, Львов, 2014); IV международной конференции «Современные проблемы генетики, радиобиологии, радиоэкологии и эволюции» (Санкт-Петербург, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 21 работа, из них 4 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 165 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитированной литературы включает 121 источник, в том числе 92 зарубежных работы. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 72 рисунками.

Финансовая поддержка исследования. Результаты диссертационного исследования получены в рамках выполнения работ по гранту РФФИ: НК-14-04-31654 «Каскадный характер наследственной изменчивости в ходе длительного направленного отбора на примере *Drosophila melanogaster*».

Положения, выносимые на защиту:

1. Транспозоны (P, hobo) играют важную роль в становлении наследственной изменчивости в линиях дикого типа *Drosophila melanogaster*: «Host» (Екатеринбург, 2005), «Биос-3» (Дзуреченск, 2007), «Белгород» (Белгород, 2006).

2. При воздействии высокими дозами ионизирующего излучения или цитостатиками чувствительные линии *Drosophila melanogaster* характеризуются пониженной фертильностью и высокой частотой доминантной эмбриональной гибели потомства, тогда как устойчивые линии, характеризуются повышенной или

в пределах нормы плодовитостью и пониженной или в пределах нормы летальностью потомства.

3. В ходе длительной направленной селекции на повреждение крыла типа «вырезка» в присутствии метотрексата наблюдается изменение стабильности генома в линиях дикого типа «Биос-3», «Белгород» и «Host».

4. Возникновение мутантных фенотипов *white*, *yellow*, *scalloped* у гибридных линий дрозофилы, полученных с использованием мутантной линии *vestigial*, в ходе селекции подтверждает наше предположение о возможной активизации транспозонов.

Методы исследования

В ходе работы использовали следующие линии дрозофилы дикого типа, отловленные в природе в разное время и в разных местах, и впоследствии культивируемые в лабораторных условиях и мутантные линии:

1. Линия «Host» – отловлена на территории г. Екатеринбурге в 2005 году.
2. Линия «Белгород» – отловлена на территории г. Белгорода в 2006 году.
3. Линия «Биос-3» – отловлена на территории Биостанции УрФУ, в окрестностях г. Двуреченска в 2007 году.
4. Линия «Дегтярск» – отловлена на территории г. Дегтярска в 2011 году.
5. Лабораторная линия *vestigial* (редуцированные крылья) – (2R:12,884,632..12,899,385).

1. Методы изучения жизнеспособности (генотоксического и тератогенного эффекта)

1.1. Метод исследования фертильности (плодовитости)

Данный метод заключается в том, что на протяжении 10-14 дней, учитывается индивидуальная плодовитость каждой пары особей в количестве 25 пар. На основании полученной плодовитости за весь период эксперимента высчитывается средняя индивидуальная плодовитость каждой пары (СИП), по следующей формуле:

$$\text{СИП} = \sum x_{yz} / N,$$

где x_{yz} – количество яиц, отложенных парой особей (y) за сутки (z); N – продолжительность эксперимента (дней).

1.2. Метод изучения частоты гибели потомства на эмбриональной стадии развития (учет эмбриональных доминантных леталей)

Доминантную эмбриональную летальность учитывали, как на ранней стадии развития (до 6 часа), так и на поздней (>6 часов) стадии эмбрионального этапа онтогенеза. Данный метод включает в себя определение неоплодотворенных яиц (патент RU 2487934; Заявитель: УрГУ, авторы: Марвин А.М., Давиденко К.А., Антосюк О.Н., Марвин Н.А.) и определение собственно ранних и поздних доминантных леталей. Ранние эмбриональные доминантные летали (РЭЛ) и поздние эмбриональные летали (ПЭЛ) вычисляются по формулам:

$$\text{РЭЛ}\% = \frac{\text{РЭЛ}}{\sum x_{yz}} \times 100\%, \quad \text{ПЭЛ}\% = \frac{\text{ПЭЛ}}{\sum x_{yz}} \times 100\%$$

где $\sum x_{yz}$ – сумма яиц, отложенных за день каждой парой дрозофил.

Схема скрещиваний:

1. самка после воздействия × самец после воздействия (облучение или цитостатики)
2. самка после воздействия × самец без воздействия
3. самка без воздействия × самец после воздействия

2. Метод морфометрического анализа крыла

Для проведения морфометрического анализа крыла 25 особей с учетом половых различий фиксировали в спирте, после чего крылья отпрепаровывали и с помощью камеры *Nikon Coolpix E4500* фотографировали. Для измерения 18 линейных и 6 двумерных (площади ячеек крыла) параметров крыловой пластинки (рис. 1) использовали программу *Universal Desktop Ruler (AVPSoft)*. Дополнительно вели учет особей с повреждением крыла типа «вырезка».

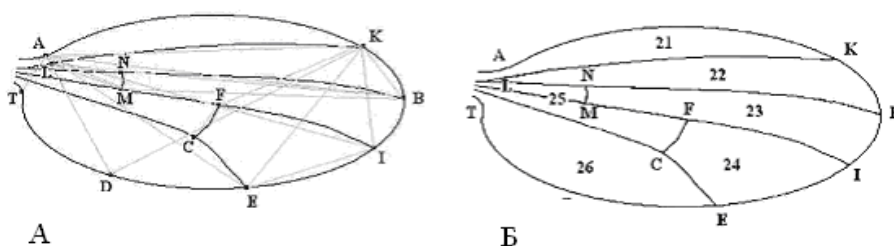


Рис. 1. Схема линейных (А) и двумерных (Б) параметров морфометрического анализа крыла *Drosophila melanogaster*.

3. ПЦР-анализ *hobo* и *hobo*-подобных элементов

Данный анализ проводили для определения количества *hobo* и *hobo*-подобных элементов после воздействия метотрексатом и после длительного направленного отбора на повреждение крыла типа «вырезка» в присутствии метотрексата. Анализ проводился на базе Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург. Копийность *hobo* элементов в 9 группах дрозофилы («Биос-3», «Белгород» и «Host» контрольные группы, группы после первичного воздействия метотрексатом и группы, подвергшиеся направленной селекции в присутствии метотрексата) оценивали методом ПЦР в реальном времени с праймерами к последовательности *hobo* элемента и гена *scalloped* (праймеры подготовлены д.б.н. Т.В. Матвеевой, СПбГУ).

4. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH-анализ) линий дикого типа для установления присутствия полноразмерных копий *hobo* и *P*-элемента

Исследование проводили на базе Института цитологии и генетики, г. Новосибирск. Для проведения анализа использовали методику изготовления давленных препаратов слюнных желез дрозофилы.

4.1. Приготовление давленных препаратов политенных хромосом слюнных желез *D. melanogaster*

Слюнные железы личинок третьего возраста, выращенных при 24 °С, извлекали в 55-65% уксусной кислоте, очищали от жировой ткани, раздавливали между предметным стеклом и покровным стеклом. Препарат замораживали, используя жидкий азот, вскрывали и обрабатывали последовательно по 5 мин в двух сменах этанола. Препарат высушивали и просматривали политенные хромосомы под фазово-контрастным микроскопом.

4.2. Гибридизация *in situ* с препаратами политенных хромосом личинок *D. melanogaster*

Мечение зондов проводили методом ник-трансляции. ДНК *hobo* метили биотином, ДНК *P*-элемента метили дегоксигенином. Окрашивание проводили с использованием Dapi с антифейдом (Vestashield). Определение цитологических сайтов проводили согласно фотографическим картам политенных хромосом *Drosophila melanogaster*.

Воздействие физическими факторами стресса

В качестве факторов физического стресса использовали рентген-излучение, γ -излучение и β -излучение (лейцин ^{14}C). Личинок облучали дозами 8,77, 17,54, 26,31 Гр, при мощности дозы 2,78, 5,56, 8,33 мГр/с, базируясь на литературных источниках. Воздействие рентген и γ -излучением проводилось Н. И. Асеевым в Свердловском областном научно-практическом центре «Онкология». Рентгеновское облучение проводилось аппаратом «РЕНТГЕН-ТА». Воздействие γ -излучением проводилось аппаратом «АГАТ-С» (Таблица 1).

Таблица №1.

Параметры облучения мух рентгеновским и гамма-излучением.

| Установка | Энергия излучения, кэВ | Мощность дозы, мГр/с | Экспозиция, с | Поглощённая доза, Гр |
|------------|-----------------------------|----------------------|---------------|----------------------|
| РЕНТГЕН-ТА | 20-100 кэВ | 146,17 | 60 | 8,77 |
| | | 146,17 | 120 | 17,54 |
| | | 154,76 | 170 | 26,31 |
| АГАТ-С | 97 кэВ (^{60}Co) | 19,49 | 450 | 8,77 |
| | | 19,49 | 900 | 17,54 |
| | | 19,49 | 1350 | 26,31 |

Радиоактивная метка лейцин ^{14}C вводилась трофическим путем. Выращивали личинок, начиная с 1-го личиночного возраста (эксперимент 1) и со 2-го личиночного возраста (эксперимент 2). Личинки прибывали на радиоактивной среде вплоть до вылета имаго. Удельная активность инкорпорированной метки 3 МБк/мл среды Альдерстона. Радиоизотоп ^{14}C ($T_{1/2} = 5730$ лет) является β -излучателем с максимальной энергией β -частиц 156,47 кэВ (средняя энергия – 49,47 кэВ).

В ходе работы были поставлены следующие варианты эксперимента:

Эксперимент 1: В каждой линии скрещивались самцы и самки, которые содержались на радиоактивной среде с 1-го личиночного возраста.

Эксперимент 2: В каждой линии скрещивались самцы и самки, которые содержались на радиоактивной среде со 2-го личиночного возраста.

Эксперимент 3: В каждой линии скрещивались меченные по ^{14}C самки (содержались с 1-го личиночного возраста) с самцами из контрольной серии.

Эксперимент 4: В каждой линии скрещивались меченные по ^{14}C самцы (содержались с 1-го личиночного возраста) с самками из контрольной серии.

Воздействие химическими факторами стресса

В качестве факторов химического стресса в исследовании использовали цитостатические препараты, используемые в химиотерапии в настоящее время, а именно:

1. Метотрексат

2. Этопозид
3. Циклофосфан
4. Митомицин-С
5. Гельданамицин

Все вышеперечисленные препараты использовали в концентрации 2 мкг/кг питательной среды. Для проведения длительной направленной селекции особей, выращенные на среде с метотрексатом, просматривали на наличие повреждения типа «вырезка» на крыле. Особей, несущих двусторонние повреждения, использовали для дальнейшей селекции в присутствии метотрексата (воздействие метотрексатом проводилось через поколение).

Полученные результаты обрабатывали, используя программу Statistica 10 (критерий Манна-Уитни для анализа жизнеспособности: СИП, РЭЛ, ПЭЛ и дискриминантный анализ для работы с крыловыми параметрами: линейными и двумерными, критерий Стьюдента для оценки КФА имагинальных дисков).

Результаты и их обсуждение

Динамика изменения параметров жизнеспособности при воздействии факторов стресса различной природы в линиях дикого типа, отловленных в природных популяциях. Влияние различных факторов стресса на геномную нестабильность ряда линий дикого типа *D. melanogaster* оценивали с помощью косвенных методов, отображающих динамику изменения жизнеспособности, а именно фертильности особей и эмбриональной доминантной летальности потомства. Как уже указывалось, воздействие производили факторами стресса физической и химической природы. В качестве факторов стресса физической природы использовали рентгеновское излучение, γ и β -излучение. В качестве факторов стресса химической природы использовали лекарственные препараты, применяемые в медицинской практике при химиотерапии.

Влияние ионизирующего излучения на показатели жизнеспособности исследовали на примере двух линий дикого типа «Биос-3» и «Белгород». Прослежен биологический эффект рентгеновского излучения в зависимости от дозы и гендерных различий. Достоверные различия (при $p \leq 0,05$) по отношению к контрольной группе по уровню плодовитости при дозе 8,77 Гр в линии «Биос-3» отмечены тогда, когда воздействию подвергались и самки, и самцы. При увеличении дозы наблюдали чувствительность самцов к облучению. В линии «Белгород» подобных значимых различий при увеличении дозы рентгеновского излучения не обнаружено (таблица 2).

Вторая серия экспериментов была направлена на установление биологического эффекта γ -излучения на вышеуказанные линии (Таблица 3).

При воздействии γ -излучения дозой 26,31 Гр СИП достоверно снижается практически во всех трех экспериментальных группах линии «Биос-3». При 17,54 и 26,31 Гр зафиксированы небольшие снижения СИП в линии «Белгород», но достоверные снижения обнаружили только в случае с облученными самцами, что свидетельствует в пользу предположения о радиостойкости линии. Дополнительно γ -излучению дозой 26,31 Гр была подвергнута линия «Host». В отличие от линий «Белгород» и «Биос-3» воздействие радиацией произвело стимулирующий эффект на СИП, но при этом значительно увеличилась и частота РЭЛ и ПЭЛ.

Таким образом, установили, что действие γ -излучения может вызывать как снижение, так и повышение уровня фертильности. Для проведения экспериментов, посвященных воздействию β -излучения, использовали лейцин, меченный ^{14}C с удельной активностью 3 МБк/мл. Достоверное снижение плодовитости отметили в следующих экспериментальных группах в линиях «Биос-3»: где воздействию подвергался либо самец, либо самка, и «Белгород»: где на разных этапах личиночного развития воздействию подвергались обе особи, а также в эксперименте с самкой.

Таблица 2.

Показатели жизнеспособности линий «Биос-3» и «Белгород» после воздействия рентгеновским излучением разными дозами ($M \pm m$)

| Показатель Линия - воздействие | СИП (средняя индивидуальная плодовитость) | РЭЛ (частота встречаемости ранней эмбриональной смертности F1) | ПЭЛ (частота встречаемости поздней эмбриональной смертности F1) |
|-----------------------------------|--|--|---|
| Биос-3-Контроль | 26,99 \pm 2,34 | 3,78 \pm 0,89 | 1,20 \pm 0,61 |
| Биос-3-8,77 Гр-♀ и ♂ | 11,99 \pm 1,45* | 6,64 \pm 1,12* | 4,72 \pm 1,14* |
| Биос-3-8,77 Гр-♀ | 13,7 \pm 2,66 | 4,00 \pm 0,94* | 2,28 \pm 0,66* |
| Биос-3-8,77 Гр-♂ | 13,14 \pm 1,68* | 5,6 \pm 1,16* | 3,22 \pm 1,01* |
| Биос-3-17,54 Гр-♀ и ♂ | 19,52 \pm 1,82 | 17,42 \pm 2,82* | 12,59 \pm 2,19* |
| Биос-3-17,54 Гр-♀ | 16,16 \pm 1,83 | 5,25 \pm 0,80* | 3,39 \pm 1,27* |
| Биос-3-17,54 Гр-♂ | 5,44 \pm 1,14* | 8,21 \pm 3,75* | 2,83 \pm 0,77* |
| Биос-3-26,31 Гр-♀ и ♂ | 13,70 \pm 2,44 | 12,81 \pm 2,38* | 2,66 \pm 0,76* |
| Биос-3-26,31 Гр-♀ | 9,14 \pm 1,57* | 5,75 \pm 2,31* | 1,88 \pm 0,61* |
| Биос-3-26,31 Гр-♂ | 2,08 \pm 0,75* | 4,27 \pm 2,33 | 2,60 \pm 1,46 |
| Белгород-Контроль | 34,49 \pm 2,77 | 1,11 \pm 0,46 | 0,73 \pm 0,23 |
| Белгород-8,77 Гр-♀ и ♂ | 11,53 \pm 1,55* | 7,58 \pm 1,28 | 4,82 \pm 1,11 |
| Белгород-8,77 Гр-♀ | 9,75 \pm 2,09* | 13,26 \pm 3,72 | 1,52 \pm 0,52* |
| Белгород-8,77 Гр-♂ | 16,78 \pm 2,37 | 5,57 \pm 1,48 | 0,32 \pm 0,17* |
| ♂ Белгород-17,54 Гр-♀ и | 13,89 \pm 2,56 | 13,86 \pm 4,94 | 1,89 \pm 0,65* |
| Белгород-17,54 Гр-♀ | 15,84 \pm 1,23 | 6,01 \pm 1,36 | 2,59 \pm 0,81 |
| Белгород-17,54 Гр-♂ | 14,60 \pm 1,75 | 9,53 \pm 2,14 | 1,25 \pm 0,37* |
| ♂ Белгород-26,31 Гр-♀ и | 16,99 \pm 1,86 | 4,77 \pm 1,65 | 3,94 \pm 0,30 |
| Белгород-26,31 Гр-♀ | 12,90 \pm 2,65 | 5,79 \pm 1,06 | 1,82 \pm 0,39* |
| Белгород-26,31 Гр-♂ | 12,76 \pm 2,11* | 9,21 \pm 2,22 | 1,03 \pm 0,27* |

Примечание: в таблице достоверные отличия выделены звездочкой.

В отношении воздействия факторов стресса химической природы наибольший интерес представляет собой изучение влияния противораковых лекарственных препаратов, а именно цитостатиков с различными механизмами действия на клетки (Таблица 4). Анализ линий на наличие повреждений типа «вырезка» на крыле показал, что повреждения появляются у особей, выращенных на препаратах, относящихся к группе антиметаболитов, таких как метотрексат.

Установлено, что генотоксический эффект, наблюдаемый при воздействии цитостатиками, у различных линий дикого типа также отличается, как и при воздействии излучением.

Таблица 3

Показатели жизнеспособности линий «Биос-3» и «Белгород» после воздействия γ -излучением разными дозами ($M \pm m$)

| Показатель Линия - воздействие | СИП (средняя индивидуальная плодовитость) | РЭЛ (частота встречаемости ранней эмбриональной смертности F1) | ПЭЛ (частота встречаемости поздней эмбриональной смертности F1) |
|-----------------------------------|--|--|---|
| Биос-3-Контроль | 26,99 \pm 2,34 | 3,78 \pm 0,89 | 1,20 \pm 0,61 |
| Биос-3-8,77 Гр-♀ и ♂ | 5,18 \pm 0,64* | 20,81 \pm 3,16* | 3,20 \pm 1,15* |
| Биос-3-8,77 Гр-♀ | 17,72 \pm 1,11 | 4,24 \pm 0,80* | 1,06 \pm 0,32* |
| Биос-3-8,77 Гр-♂ | 19,13 \pm 2,75 | 2,63 \pm 0,86 | 1,57 \pm 0,45* |
| Биос-3-17,54 Гр-♀ и ♂ | 15,59 \pm 1,37 | 18,87 \pm 3,30* | 6,69 \pm 1,90* |
| Биос-3-17,54 Гр-♀ | 13,55 \pm 1,42* | 3,73 \pm 0,79* | 1,74 \pm 0,33* |
| Биос-3-17,54 Гр-♂ | 13,20 \pm 1,10* | 3,89 \pm 1,55 | 2,84 \pm 1,25 |
| Биос-3-26,31 Гр-♀ и ♂ | 3,49 \pm 0,99* | 24,74 \pm 4,53* | 2,46 \pm 0,66* |
| Биос-3-26,31 Гр-♀ | 7,83 \pm 1,71* | 9,37 \pm 2,27* | 1,05 \pm 0,30* |
| Биос-3-26,31 Гр-♂ | 14,12 \pm 1,17 | 7,15 \pm 1,80* | 7,07 \pm 0,83* |
| Белгород-Контроль | 34,49 \pm 2,77 | 1,11 \pm 0,46 | 0,73 \pm 0,23 |
| Белгород-8,77 Гр-♀ и ♂ | 7,68 \pm 1,06* | 21,65 \pm 5,64* | 2,64 \pm 0,80 |
| Белгород-8,77 Гр-♀ | 24,91 \pm 2,87* | 12,95 \pm 4,03 | 1,70 \pm 0,47* |
| Белгород-8,77 Гр-♂ | 22,18 \pm 2,92* | 3,30 \pm 0,84 | 1,86 \pm 0,56* |
| Белгород-17,54 Гр-♀ и ♂ | 14,80 \pm 1,56 | 5,49 \pm 1,83 | 3,38 \pm 1,14 |
| Белгород-17,54 Гр-♀ | 14,12 \pm 3,37 | 1,16 \pm 0,30* | 1,09 \pm 0,66* |
| Белгород-17,54 Гр-♂ | 30,19 \pm 3,01* | 1,89 \pm 0,98* | 0,96 \pm 0,36* |
| Белгород-26,31 Гр-♀ и ♂ | 17,58 \pm 1,77 | 11,31 \pm 1,24 | 1,70 \pm 0,53* |
| Белгород-26,31 Гр-♀ | 11,25 \pm 2,20 | 14,09 \pm 4,10 | 2,04 \pm 0,66* |
| Белгород-26,31 Гр-♂ | 10,23 \pm 1,63* | 7,58 \pm 3,12 | 4,27 \pm 3,26* |

Примечание: в таблице достоверные отличия выделены звездочкой.

Таблица 4.

Показатели жизнеспособности линий дикого типа *Drosophila melanogaster* при воздействии цитостатических препаратов: метотрексат, митомицин-С, циклофосфан, этопозид, гелданамицин (2 мкг/кг среды) ($M \pm m$).

| Линия | Воздействие | СИП (средняя индивидуальная плодовитость) | Частота встречаемости ранней эмбриональной смертности F1 | Частота встречаемости поздней эмбриональной смертности F1 |
|----------|--------------|--|--|---|
| Биос-3 | Метотрексат | 12,44 \pm 1,42* | 2,52 \pm 0,77 | 1,01 \pm 0,26 |
| | Митомицин-С | 25,59 \pm 2,05 | 1,30 \pm 1,04 | 0,15 \pm 0,06* |
| | Этопозид | 21,91 \pm 1,71 | 3,54 \pm 0,91 | 1,19 \pm 0,41 |
| | Циклофосфан | 10,06 \pm 1,85* | 1,59 \pm 0,37 | 0,54 \pm 0,10* |
| | Гелданамицин | 6,54 \pm 1,83* | 2,92 \pm 1,09 | 0,61 \pm 0,23 |
| | Контроль | 26,99 \pm 2,34 | 3,78 \pm 0,89 | 1,20 \pm 0,61 |
| Белгород | Метотрексат | 21,68 \pm 1,62 | 2,50 \pm 0,74 | 1,84 \pm 0,52 |
| | Митомицин-С | 30,58 \pm 2,42* | 0,23 \pm 0,22 | 0,13 \pm 0,09 |
| | Этопозид | 28,36 \pm 1,61* | 4,48 \pm 0,85 | 0,45 \pm 0,12 |
| | Циклофосфан | 19,99 \pm 1,89 | 0,75 \pm 0,20 | 0,40 \pm 0,11 |
| | Гелданамицин | 3,24 \pm 0,98* | 13,94 \pm 3,24 | 0,57 \pm 0,22 |
| | Контроль | 34,49 \pm 2,77 | 1,11 \pm 0,46 | 0,73 \pm 0,23 |
| Host | Метотрексат | 17,79 \pm 2,26 | 3,70 \pm 1,14 | 0,96 \pm 0,36 |
| | Митомицин-С | 24,40 \pm 1,60 | 0,11 \pm 0,09* | 0,06 \pm 0,05 |
| | Этопозид | 23,54 \pm 1,73 | 6,4 \pm 1,31 | 0,59 \pm 0,13 |
| | Циклофосфан | 15,30 \pm 2,20 | 1,43 \pm 0,52 | 0,06 \pm 0,02 |
| | Гелданамицин | 0,57 \pm 0,24* | 15,20 \pm 3,80 | 0,54 \pm 0,38 |
| | Контроль | 18,74 \pm 2,67 | 3,11 \pm 0,92 | 0,66 \pm 0,21 |

Примечание: в таблице достоверные отличия выделены звездочкой.

Устойчивость к различным препаратам линии Host нарушается при воздействии гелданамицином. Максимальную СИП и минимальные РЭЛ и ПЭЛ отметили при воздействии митомицином-С. Избирательность в более сильном эффекте на одни факторы стресса, и менее выраженном эффекте при действии других факторов обуславливает линейные различия, а также может возникать благодаря исходному адаптационному резерву (амплификация, большая геномная стабильность, меньшая частота летальности на эмбриональной стадии).

Морфометрический анализ крыла как метод оценки воздействия факторов стресса на геномную нестабильность. Изменение пространственной структуры крыловой пластинки является одним из важных показателей, отражающих воздействие различных факторов стресса, в том числе и косвенно на геномную нестабильность. Для более полного анализа действия факторов стресса на соматические клетки имагинального крылового диска и развивающегося из него крыла использовали следующие показатели:

1. Частота встречаемости рентгеноморфозов и хемоморфозов типа «вырезка» на крыле.
2. Определение коэффициента флуктуирующей асимметрии (КФА) имагинальных дисков при воздействии γ -излучения.
3. Морфометрический анализ крыла.

Было произведено вычисление КФА с учетом половых различий. Линейные различия проявляются: «Биос-3» КФА увеличивается в 1,1 раза у самок и в 1,5 раза у самцов относительно контрольной группы. В линии «Белгород» КФА понизился в 1,3 раза у самок и в 2,5 раза у самцов. Морфометрический анализ крыла позволил установить, что воздействие различных видов излучения приводит к изменению пространственной структуры крыла. Подтверждается предположение о том, что облучение любой из использованных доз однозначно меняет соотношение параметров крыла, в данном случае на уровне площади ячеек. Изменение пространственной структуры крыла в использованных линиях «Биос-3» и «Белгород» обнаружили при воздействии инкорпорированной метки ^{14}C и установили наличие пролонгирующего эффекта β -излучения. Значительные отклонения пространственной структуры крыла от контрольной выборки наблюдали при дозах 7,88 и 26,31 Гр как при рентгеновском, так и при γ -излучении.

Анализ изменения пространственной структуры крыла в линиях дикого типа «Биос-3» и «Белгород» показал:

- пространственная структура крыла всегда отражает наличие/отсутствие воздействия ионизирующего излучения, независимо типа излучения (рентген, γ или β) и независимо от дозы (относительно доз, использованных в работе);
- сравнительный анализ морфометрических показателей крыла позволяет определить зону, наиболее подверженную изменениям в результате воздействия ионизирующего излучения;
- поглощенная доза 7,88 Гр как в случае γ -излучения, так и рентгеновского излучения, приводит к самым значительным отличиям соотношений морфометрических параметров крыла, по сравнению с контролем и дозами мощностью 17,54 и 26,31 Гр (показано на двух исследованных линиях дикого типа) (рис. 2);
- линия дикого типа «Биос-3» обнаруживает большую радиочувствительность, по сравнению с линией «Белгород»;

- у двух экспериментальных линий дикого типа обнаружили наличие пролонгирующего эффекта на уровне морфометрических характеристик крыла в условиях хронического β -облучения.

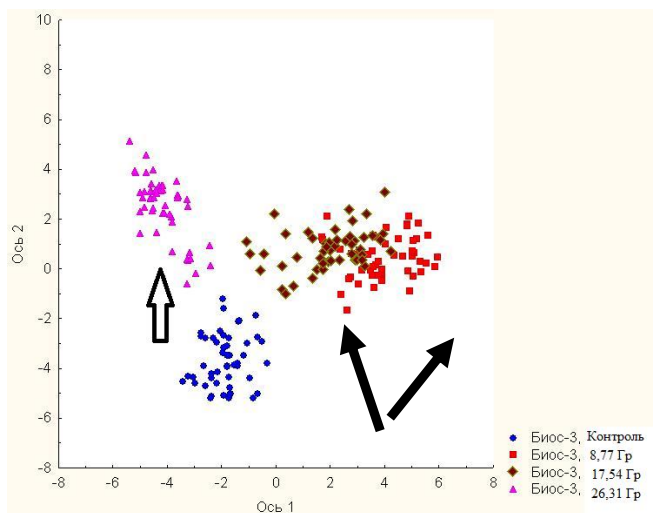


Рис. 2. Канонический анализ морфометрических показателей крыла выборок линии «Биос-3» *Drosophila melanogaster*, полученных в условиях воздействия γ -излучения.

Полученные нами данные о различной реакции линий на цитостатические препараты, подтверждают предположение о линейных различиях, и соответственно, различной активности и возможной копийности транспозонов. Исходя из данных анализа, можно предположить, что препараты этопозид и циклофосфан изменяют линейные и двумерные параметры крыловой пластинки в определенном направлении (рис. 3), данный эффект наблюдается во всех трех линиях. Установили, что у всех трёх линий дикого типа «Белгород», «Биос-3» и «Host» двумерные параметры изменяются во всех экспериментах относительно контрольной группы. Анализируя линейные параметры, установили, что в линиях «Биос-3» и «Белгород» изменяется как ширина крыловой пластинки, так и длина, а в случае с линией «Host» изменению подлежат параметры, характеризующие ширину крыла. Воздействие на данную линию гелданамицина вызывает сильный тератогенный эффект. В работах (Specchia et al., 2010) авторами было высказано предположение о возможном всплеске активности транспозонов благодаря ингибированию Hsp90.

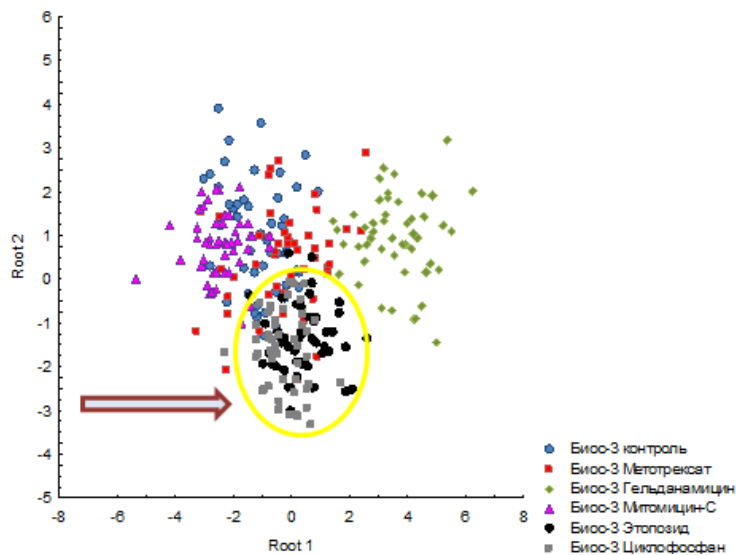


Рис. 3. Канонический анализ линейных морфометрических показателей крыла выборок линии «Биос-3» *Drosophila melanogaster*, полученных в условиях присутствия цитостатических препаратов.

Резюмируя вышесказанное можно отметить следующее:

1. Различная чувствительность к группе цитостатиков, которые используются в работе, свидетельствует о наличии линейных отличий среди особей линий дикого типа.
2. Морфометрический анализ крыла демонстрирует сходство биологического эффекта цитостатиков с отличающимся механизмом действия на клетки среди используемых в работе препаратов.
3. Линейные различия в отношении чувствительности к повреждающим агентам, а также возможная активизация транспозонов на фоне общего генотоксического эффекта могут быть обнаружены в ходе морфометрического анализа.
4. В результате исследований с использованием ряда методов предположили, что наибольшая геномная нестабильность (общий генотоксический эффект) прослеживается на фоне воздействия гельданамицина и метотрексата.

Сравнительный анализ результатов длительной направленной селекции на частоту повреждения крыла в линиях дикого типа в присутствии метотрексата и гибридных линиях гетерозиготных по *vestigial*. В данном разделе проведены результаты сравнительного анализа изменения пространственной структуры крыла у линий дикого типа, изменяющиеся при воздействии метотрексатом, усиливающим апоптоз у гетерозигот по мутантной аллели *vestigial*, также усиливающей апоптоз. Исходное наличие транспозонов в используемых линиях определялось при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ*. Было показано наличие как *hobo*, так и *P* элемента во всех 4 хромосомах. Использовали линию «Биос-3» и «Host». В связи с гетерогенностью линий на препаратах наблюдается расконъюгация хромосом, а также локализация транспозонов в различных местах. Но также имеются транспозоны, локализация которых более стабильна, например, в линии «Биос-3» в X-хромосоме заметно расположение в начале трёх *P* – элементов, затем три *hobo* – элемента, средний из которых упакован между двумя *P*. Что касается линии «Host», то можно наблюдать

в начале X-хромосомы чередование *hobo-P-hobo-P-hobo-hobo-hobo-hobo* (рис. 4). Подтверждение присутствия транспозонов *hobo* и *P* в данных линиях послужило для использования этих линий в дальнейших исследованиях, посвященных длительной направленной селекции. Изменение геномной нестабильности, как в ходе длительного отбора при воздействии факторов стресса, так и при единичном воздействии, косвенно демонстрирует морфометрический анализ крыла. Результаты, полученные в исследованиях, посвященных длительному отбору линий дикого типа «Биос-3», «Белгород» и «Host» с использованием ПЦР-анализа, свидетельствуют о различной чувствительности линий к такому фактору стресса как метотрексат (таблица 5).

Таблица 5

Средние значения пороговых циклов в ПЦР с праймерами к последовательностям *scalloped* и *hobo* на ДНК в экспериментальных группах дрозофилы.

| Показатель Генотип | C ₀ t среднее (hobo*) | среднее (sd) | □ C ₀ t |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------------|
| Host P | 22,9 ± 0,03 | 34,2 ± 1,78 | 11 ± 1,8 |
| Host F ₆₀ | 16,4 ± 0,45 | 35,4 ± 0,74 | 19 ± 1,2 |
| Host-Контроль | 17,2 ± 0,08 | 34,5 ± 1,32 | 17,3±1,4 |
| Белгород P | 21,5 ± 0,18 | 38 ± 0,47 | 17 ± 0,7 |
| Белгород F ₇₂ | 22,1 ± 0,06 | 34,6 ± 1,9 | 13 ± 2,0 |
| Белгород-Контроль | 16 ± 0,06 | 37,2 ± 0,51 | 21 ± 0,6 |
| Биос-3 P | 19,2 ± 0,07 | 38 ± 0,47 | 19 ± 0,5 |
| Биос-3 F ₇₆ | 15,3±0,06 | 38,5 ± 1,17 | 23 ± 1,2 |
| Биос-3-Контроль | 14,9 ± 0,11 | 34 ± 1,88 | 19 ± 2,0 |

Исходя из полученных данных, можно предположить тенденцию изменения относительного количества копий *hobo* и *hobo*-подобных элементов в относительных единицах (таблица 5). Опираясь на увеличение □C₀t, полученные в нескольких повторах для каждого эксперимента, а также в идентичных условиях проведения реакции линия «Host» после длительной направленной селекции относительно контрольной выборки и выборки после первичного воздействия метотрексатом может быть охарактеризована повышением количества *hobo* и *hobo*-подобных элементов. В линии «Биос-3» усиление активности мобильных генетических элементов более выражено после длительной направленной селекции в присутствии метотрексата, т.к. величина □C₀t достигает 23 ± 1,2 по отношению с контролем и выборкой после первичного воздействия. В линия «Белгород» наблюдается дезактивация *hobo*, т.к. снижается □C₀t по сравнению с контролем почти в 2 раза. В задачи данного исследования не входил количественный анализ и установление молекулярно-генетических механизмов, связанных с изменением копийности МГЭ, в связи, с чем полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего анализа, так как полученные величины могут быть связаны с накоплением нехромосомных копий МГЭ, неравной эффективностью ПЦР-реакции.



Рис. 4. Препарат слюнных желез личинок линии «Host». Локализация Р-элемента (красный) показана голубыми стрелками, локализация hobo – элемента (зеленый) показана желтыми стрелками.

В линии «Биос-3» изменяются линейные параметры крыла, характеризующие ширину крыловой пластинки, в то время как в линии «Host» меняются как параметры: KI, KF, AK, AM, NM, FC. Изменяется АК, отвечающий за длину верхней части крыловой пластинки, наиболее часто подвергающейся усиленному апоптозу (Martin et al., 2009), (рис. 5). В линиях «Биос-3» и «Host» площади ячеек крыла изменяются. Несколько иную картину можно выявить у особей, подвергшихся длительному отбору на метотрексате, в линии «Белгород». Изменению не подвергаются такие значительные по размеру ячейки крыла, как 24 и 26 (рис. 1), составляющие практически 50% крыловой пластинки. В линии «Белгород», в ходе отбора крыловая пластинка незначительно видоизменяется по соотношению параметров, что, вероятно, свидетельствует о малой активизации мобильных генетических элементов, либо даже их дезактивизации, данную тенденцию к уменьшению можно объяснить возможностью эксцизии транспозонов (Atkinson et al., 1993). Для более информативного установления копийности возможно использование дополнительных методов ПЦР.

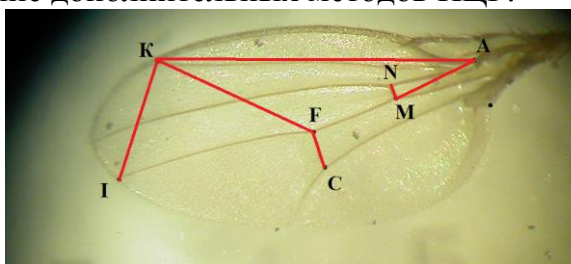


Рис. 5. Схема линейных параметров морфометрического анализа крыла линии «Host», изменяющихся при воздействии длительной направленной селекции на метотрексате относительно контрольной группы и родительского поколения (Р), выращенном на метотрексате.

Результаты длительной направленной селекции на метотрексате сравнили с результатами исследований гетерозигот, полученными с использованием линии, характеризующейся рецессивной морфологической мутацией *vestigial* (*vg*, II: 57,0 сМ), выделенной в 1912 году. Ранее было обнаружено, что частота появления повреждения крыла у гетерозиготных особей $vg+ / vg$, в зависимости от линии

дикого типа, изменялась в пределах от 0,2 до 74,4% (Goux et al., 1974). Было выбрано 4 линии («Биос-3», «Белгород», «Host», «Дегтярск») и произведено скрещивание с особями *vg*. Направленный отбор на повреждение крыла типа «вырезка» привел к появлению мутантных фенотипов в трех линиях из четырех. Индуцированный мутагенез наблюдался в линиях «Биос-3×*vg*», «Host×*vg*» и «*vg*×Дегтярск». В линии «Белгород×*vg*» за 148 поколений отбора не обнаружено возникновения мутантных фенотипов. В линии «Биос-3×*vg*» обнаружен в F₅₀ фенотип *white*, характеризующийся отсутствием пигмента в глазах дрозофилы. В линии «Host×*vg*» обнаружен *scalloped*, проявляющийся в зазубренном крае крыла у дрозофилы. В линии «*vg*×Дегтярск» обнаружен мутантный фенотип *yellow*, определяемый как желтое тело у дрозофилы. Используя морфометрический анализ, установили, что на начальных этапах селекции крыловые параметры ещё менее дисперсные, но с ходом отбора различия в выборках становятся всё более выраженными.

Выводы

1. В результате проведенного анализа наследственной изменчивости в линиях дикого типа *Drosophila melanogaster*: «Host» (Екатеринбург, 2005), «Белгород» (Белгород, 2006), «Биос-3» (Дзуреченск, 2007) установлено, что мобильные генетические элементы (транспозоны *P* и *hobo*) могут играть немаловажную роль в становлении наследственной изменчивости, особенно при длительной направленной селекции.

2. При воздействии высокими дозами ионизирующих излучений, либо цитостатиками линии, условно обозначенные нами как чувствительные («Биос-3») характеризуются в большинстве случаев пониженной фертильностью и высокой частотой доминантной эмбриональной гибели потомства, тогда как линии, обозначенные как устойчивые («Белгород»), характеризуются повышенной или в пределах нормы плодовитостью и пониженной либо в пределах нормы летальностью потомства.

3. Гетерогенность локализации *P* и *hobo* элементов в линиях дикого типа «Биос-3» и «Host» определена нами как высокая. Большинство *P* и *hobo* элементов расположены не одинаково, но некоторые из транспозонов можно локализовать как стабильные.

4. Исследовали воздействие стресса химической и физической природы на соматические клетки (изменение пространственной структуры крыла). Установили, что цитостатики: этопозид и циклофосфан действуют на изменение пространственной структуры крыла сходным образом. Гельданамицин, митомицин-С и метотрексат также изменяют морфометрические параметры крыловой пластинки. Воздействие ионизирующих излучений на соматические клетки имагинальных крыловых дисков зависит от чувствительности линии. Лейцин, меченный по ¹⁴C, влияет на соматические клетки имагинальных дисков, изменяя крыловые параметры как в линии «Биос-3», так и в линии «Белгород».

5. Уменьшение копийности *hobo* происходит при первичном воздействии метотрексата во всех трех линиях: «Биос-3», «Белгород» и «Host». Длительная направленная селекция в присутствии метотрексата приводит к тому, что в линии «Host» происходит увеличение копийности *hobo* элемента, в линии «Биос-3» наблюдается максимальное увеличение копийности *hobo*, а в линии «Белгород» происходит уменьшение копийности *hobo*. Возможные механизмы изменения

количества копийности *hobo*: амплификация и эксцизия. Различия в копийности можно дополнительно исследовать другими ПЦР методами.

6. Результаты морфометрического анализа показывают изменение пространственной структуры крыла у гибридных линий, полученных с использованием линий дикого типа и мутантной линии *vestigial*, подвергнутых длительной направленной селекции с изменением пространственной структуры крыла с линиями, подвергшимися длительной направленной селекции в присутствии метотрексата. Несмотря на то, что в обоих случаях происходит изменение активности дигидрофолатредуктазы, пространственная структура крыла в случае химического стресса отличается от таковой при направленном отборе на усиление апоптоза в крыловом имажинальном диске у гетерозигот по *vestigial*. Возникновение мутантных фенотипов в ходе селекции свидетельствует в пользу нашего предположения о возможной активизация транспозонов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Антосюк О.Н. Радиоустойчивость различных линий в зависимости от их природы, источника излучения и гендерных различий / О.Н. Антосюк, К.А. Давиденко, Н.С. Затай, Л.В. Крысова // Сборник тезисов конференции «Биосфера Земли: прошлое, настоящее и будущее». – ИЭРиЖ УрО РАН. - Екатеринбург, 2008. – С.7-9.
2. Антосюк О.Н. Биологический эффект различных видов ионизирующих излучений / О.Н. Антосюк, Л.В. Крысова, К.А. Давиденко, Н.А. Марвин, А.М. Марвин // Материалы конференции «Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека». - Scientific and Technical Translations. – Томск, 2009. – С. 55-59.
3. Антосюк О.Н. Пролонгирующий эффект источников внешнего и внутреннего облучения у *Drosophila melanogaster* / О.Н. Антосюк, К.А. Давиденко, Л.В. Крысова, Н.А. Марвин // Сборник тезисов XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «молодые ученые в медицине». – Казань, 2009. – С.160.
4. Антосюк О.Н. Дискриминантный анализ морфометрических показателей как метод оценки состояния окружающей среды / О.Н. Антосюк, Л.В. Крысова, К.А. Давиденко // Сборник тезисов XIV Международной студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий». – Новосибирск, 2009. – С. 197.
5. Крысова Л.В. Влияние цитостатиков, из группы антиметаболитов синтеза ДНК на соматические клетки *Drosophila melanogaster* / Л.В. Крысова, О.Н. Антосюк, К.А. Давиденко, Е.В. Потемкина // Сборник тезисов XV Международной студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий». – Новосибирск, 2010. – С. 200.
6. Антосюк О.Н. Пролонгирующий эффект метки ^{14}C как проявление нестабильности генома в линиях дикого типа *Drosophila melanogaster* / О.Н. Антосюк, К.А. Давиденко, А.М. Марвин // Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия-2010». – Нижний Новгород, 2010. – С. 87-88.
7. Антосюк О.Н. Влияние метотрексата на нестабильность генома *Drosophila melanogaster* / О.Н. Антосюк, Л.В. Крысова, К.А. Давиденко, Е.В.

Потемкина, А.М. Марвин // Материалы II Міжнародна конференції «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології». – Україна, Одеса, 2010. – С. 17-20.

8. Антосюк О.Н. Биологический эффект бета-излучения на примере модельной системы *Drosophila melanogaster* / О.Н. Антосюк, К.А. Давиденко, Н.А. Марвин, Л.В. Крысова, А.М. Марвин // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Тяжелые металлы и радионуклиды в окружающей среде». – Казахстан, Семипалатинск, 2010. – С. 244-249.

9. Антосюк О.Н. Сравнительный анализ пролонгирующего эффекта радиационного и химического стресса на примере *Drosophila melanogaster* / О.Н. Антосюк, К.А. Давиденко, Л.В. Крысова, А.М. Марвин // Материалы международного научно-практического семинара «Экология стабильного развития. Рациональное природопользование». – Тула, 2010. – С. 39-42.

10. Марвин Н.А. Влияние стрессов различной природы на уровень апоптоза на примере модельного объекта *Drosophila melanogaster* / Н.А. Марвин, Л.В. Крысова, К.А. Давиденко, О.Н. Антосюк // сборник тезисов Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». – Санкт-Петербург, 2010. – С. 90.

11. Антосюк О.Н. Влияние противораковых препаратов на нестабильность генома *Drosophila melanogaster* / О.Н. Антосюк, Е.В. Потемкина, А.М. Марвин // Сборник тезисов V всероссийского с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012». – Тверь, 2012. – С. 206-208.

12. Антосюк О.Н. Морфометрический анализ крыла *Drosophila melanogaster* как тест-система при изучении стрессов на молекулярно-генетическом уровне / О.Н. Антосюк, С.В. Шихова, Н. А. Марвин, А.М. Марвин // Сборник тезисов конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии». – Ростов-на-Дону, 2013. – С. 7.

13. Антосюк О.Н. Влияние метотрексата на активность hobo-элемента в линиях дикого типа *Drosophila melanogaster* / О.Н. Антосюк, А.М. Марвин, Л.В. Крысова, Е.В. Потемкина // Сборник тезисов VI Всероссийского с международным участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013». – Иркутск, 2013. – С. 282.

14. Антосюк О.Н. Сравнительный анализ воздействия цитостатических препаратов на нестабильность генома *Drosophila melanogaster* / О.Н. Антосюк, А.М. Марвин, Н.А. Марвин // Биомедицина. – 2014. – №3. – С. 83-91.

15. Antosyuk O.N. The influence of long direct selection on a mutagenesis of heterozygotes $vg^{+}vg$ / Antosyuk O.N., Marvin N.A., Shihova S.V. // Abstracts Paper by young scientists IV International Conference, dedicated to N.W. Timofeeff-Resovsky and his Scientific school «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology, and evolution». – St.Petersburg, 2015. – P. 17.

16. Антосюк О.Н. Влияние цитостатиков антиметаболического ряда на пространственную структуру крыла линий дикого типа *Drosophila melanogaster* / Антосюк О.Н., Распопова Е.Д., Шихова С.В. // Сборник тезисов конференции «Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам». – Киров, 2015. – С. 253-255.

17. Антосюк О.Н. Влияние метотрексата на изменение пространственной структуры крыла у линий дикого типа *Drosophila melanogaster* как косвенный показатель нестабильности генома // Материалы IV Всероссийской конференции

«Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы». – Улан-Удэ, 2016. – С. 15-16.

18. Антосюк О.Н. Воздействие метотрексата на линии дикого типа и гибридные линии гетерозиготные по гену *vestigial Drosophila melanogaster*, полученные в ходе длительной направленной селекции / О.Н. Антосюк // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. - Тамбов, 2016. - Т. 21. - Вып. 6. - С. 1867-1870.

19. Антосюк О.Н. Воздействие метотрексата на соматические клетки крыла на примере модельного объекта *Drosophila melanogaster* / О.Н. Антосюк // Биофармацевтический журнал. - 2016. - Т. 8. - №4. - С. 3-8.

20. Антосюк О.Н. *Drosophila melanogaster* как модельный объект при изучении биологического эффекта метотрексата (Methotrexate) / О.Н. Антосюк, А.М. Марвин // Токсикологический вестник. – 2016. – №4. - С. 45-48.

21. Антосюк О.Н. Влияние направленной селекции на повреждение крыла типа «вырезка» на примере гибридных линий гетерозиготных по *vestigial* / Антосюк О.Н., Мухаметзянова А.Ш. // Материалы международной научной конференции «Генетика популяций: прогресс и перспективы». – Москва, 2017. – С. 10-11.